

Atividades lipolíticas em polpa e óleo de frutos de dendê



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 25

Atividades lipolíticas em polpa e óleo de frutos de dendê

*Carolina Medeiros Romera
Cibele Favoreto dos Santos
Daniela Flávia Machado Turati
Diogo Keiji Nakai
Letícia Jungmann Cançado
Thaís Demarchi Mendes
Thályta Fraga Pacheco
Dasciana de Sousa Rodrigues*

***Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2021***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroenergia

Presidente
Patrícia Verardi Abdelnur

Secretária-Executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros
*Adilson Kenji Kobayashi, André Pereira Leão,
Dasciana de Sousa Rodrigues, Emerson Léo
Schultz, Felipe Brandão de Paiva Carvalho,
Thais Fabiana Chan Salum, Wesley Gabriel de
Oliveira Leal*

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Iara Del Fiacco Rocha (CRB-1/2169)

Tratamento das ilustrações
Maria Goreti Braga dos Santos

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Goreti Braga dos Santos

Foto da capa
Photographer/IStock

1ª edição
Publicação digital (2021)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa, Secretaria-Geral

Atividades lipolíticas em polpa e óleo de frutos de dendê / Carolina Medeiros
Romera ... [et al.]. – Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2021.

PDF (30 p.) : il. color. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Agroenergia, ISSN 2177-0395 ; 25)

1. Elaeis Guineensis. 2. Lipase. 2. Acidificação. 3. Hidrolise. 4. Ácido graxo.
I. Romera, Carolina Medeiros. II. Santos, Cibele Favoreto dos. III. Turatti, Daniela
Flávia Machado. IV. Nakai, Diogo Keiji. V. Cançado, Letícia Jungmann. VI.
Mendes, Thais Demarchi. VII. Pacheco, Thályta Fraga. VIII. Rodrigues, Dasciana
de Sousa. IX. Série.

CDD 630

Sumário

Resumo5

Abstract7

Introdução.....9

Material e Métodos 11

Resultados e Discussão14

Conclusões.....28

Referências29

Atividades lipolíticas em polpa e óleo de frutos de dendê

Carolina Medeiros Romera¹

Cibele Favoreto dos Santos²

Daniela Flávia Machado Turati³

Diogo Keiji Nakai⁴

Letícia Jungmann Cançado⁵

Thaís Demarchi Mendes⁶

Thálya Fraga Pacheco⁷

Dasciana de Sousa Rodrigues⁸

Resumo – Um dos principais desafios da coleta e extração de óleo de frutos de dendê (palma de óleo) é a manutenção da qualidade do óleo, de forma a evitar a liberação de ácidos graxos, que mudam as propriedades do óleo e, conseqüentemente, reduzem seu valor comercial. A liberação desses ácidos é atribuída à ação de lipases. Entretanto, não há um consenso quanto à fonte das enzimas que hidrolisam excessivamente o óleo, se ela é endógena (produzida pelo próprio fruto de dendê) ou exógena (produzida por um determinado microrganismo que colonizou o fruto de dendê). Neste trabalho, a verificação da presença de lipases no mesocarpo de frutos de dendê foi realizada por meio de reações de hidrólise. Dessa maneira, as proteínas contidas no mesocarpo de dendê foram adicionadas a reatores contendo óleo, e a liberação de ácidos graxos após a hidrólise desse óleo foi monitorada ao longo do tempo. As proteínas presentes no mesocarpo foram aplicadas ao reator de duas maneiras: 1) na forma de uma polpa macerada de mesocarpo e 2) na forma de um extrato proteico, ou seja, como proteínas parcialmente

¹ Química, mestre em Química, colaboradora na Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

² Química, mestre em Bioenergia, colaboradora na Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, colaboradora na Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁴ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Ciências Mecânicas, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁷ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁸ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

purificadas, isoladas dos demais componentes do mesocarpo. As amostras de frutos de dendê utilizadas neste estudo foram obtidas de uma variedade comercial de dendezeiro, *Elaeis guineensis* Jacq. BRS2501 (Lima et al., 2013). Os protocolos utilizados para detectar os produtos gerados (ácidos graxos) nos testes de atividade de lipases totais envolveram a titulação e a cromatografia líquida. Os testes para lipases realizados em titulador automático indicaram redução no valor de pH ao longo do tempo, quando a polpa macerada do mesocarpo foi adicionada ao reator contendo o substrato (óleo). Entretanto, a titulação não é um método seletivo e pode detectar qualquer fenômeno em que haja liberação de íons H^+ . Devido a isto, não se pode afirmar que a redução do pH observada nos testes de atividade enzimática estaria necessariamente sendo causada pela liberação dos ácidos graxos. Por isso as amostras foram também analisadas por cromatografia líquida. A análise cromatográfica de amostras coletadas dos ensaios de hidrólise da polpa macerada de dendê, realizados em titulador automático sob diferentes valores de pH, indicou a ação de lipase(s) na liberação de ácidos, tais como: oleico, linoleico, palmítico e esteárico. Pela análise dos produtos da hidrólise de óleo de dendê por meio de cromatografia líquida, conclui-se que o valor de pH em que a(s) lipase(s) apresentam melhor desempenho é o pH 5, enquanto os ensaios titulométricos indicam o pH 7. Isso ocorre, provavelmente, devido à limitação do método titulométrico para a detecção dos ácidos graxos a pH 5,0, no qual os ácidos graxos são fracamente dissociados. Neste trabalho, a ação de lipases sobre o óleo de dendê foi comprovada, mas os dados não são conclusivos quanto à origem dessa ação, se ela é endógena ou exógena. Assim, outras ações, como análise metagenômica (microrganismos cultiváveis e não cultiváveis) versus o secretoma (metabólitos e proteínas), devem ser aplicadas para que se possa identificar a procedência das lipases presentes na polpa dos frutos do dendê.

Termos para indexação: lipase, fruto de dendê, acidificação, hidrólise, caracterização, ácidos graxos.

Determination of lipolytic activities in the palm oil fruit

Abstract – One of the main challenges during the harvest of palm fruits and the extraction of oil from them is the maintenance of oil quality, avoiding the release of fatty acids, which change the properties of the oil and, consequently, reduce its commercial value. Usually, the release of fatty acids in palm fruits is due to lipases. However, there is no consensus on which lipases (endogenous or exogenous) are responsible for acidification. Previous studies have confirmed the presence of endogenous and exogenous lipases in oil palm fruit mesocarp. However, data on the concentration of these enzymes and their biochemical characterization are scarce, and it is due to the difficulty in isolating the lipase from the oil palm fruit mesocarp in its active form. In this work, the lipolytic activity was studied in samples of palm fruits produced by cultivar BRS 2501. The hydrolysis assays were performed using both mesocarp paste and protein extracts obtained from it. The methods used to detect the products of enzyme reaction were: titration and liquid chromatography. Titration in the pH-stat indicated that mesocarp paste gave a rate of acid appearance. However, it is not a selective method, so the appearance of any substance that releases hydrogen ions could be mistaken for the release of fatty acids. The products of the enzyme reaction were also analyzed by liquid chromatography to determine if the reaction medium's pH reduction is due to the appearance of fatty acids. Samples from mesocarp paste hydrolysis tests performed at different pH values were analyzed by HPLC and confirmed the action of lipases, with pH 5 being the optimum value. The main products determined by HPLC were oleic, linoleic, palmitic, and stearic acids. On the other hand, titrimetric tests indicated pH 7 as the optimal pH value. This behavior is probably due to the limitation of the titrimetric method for the detection of fatty acids at pH 5.0, in which they are weakly dissociated. In this work, the action of lipases on palm oil was confirmed by chromatographic and titrimetric methods, however, the data are not conclusive as to their origin, whether endogenous or exogenous.

Index terms: lipase, palm oil fruit, acidification, hydrolysis, characterization, fatty acids.

Introdução

O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais de óleo de palma (dendê). Esse óleo é aplicado na indústria de alimentos, cosméticos, higiene e limpeza, agroenergia e biocombustíveis (Dendê, 2020). A elevada qualidade do óleo produzido é uma exigência para sua aplicação industrial.

O atrito entre os frutos de dendê durante a coleta, associado ao esmagamento desses frutos durante o processo de extração do óleo, pode causar o espalhamento de lipases na polpa de mesocarpo. Essas lipases catalisam a liberação de ácidos graxos a partir dos triglicerídeos que compõem o óleo. A elevada concentração de ácidos graxos causa mudanças nas propriedades do óleo e, consequentemente, reduz seu valor comercial (Sambanthamurthi et al., 2000; Cadena et al., 2013).

As lipases que causam a liberação dos ácidos graxos em frutos de dendê podem ser de origem exógenas (Tombs; Stubbs, 1982) ou endógenas (Morcillo et al., 2013). Quanto às lipases endógenas, dados da literatura científica indicam que há plantas que apresentam elevada atividade dessas enzimas e outras que apresentam baixa atividade. Entretanto, mesmo as plantas com baixa atividade de lipases endógenas não estão livres da excessiva liberação de ácidos graxos, pois estudos têm confirmado que frutos ricos em óleo podem ser colonizados por microrganismos e, nesse caso, a liberação dos ácidos graxos ocorre pela ação de lipases exógenas (Tombs; Stubbs, 1982; Morcillo et al., 2013; Cavalcanti-Oliveira et al., 2015).

O isolamento e a caracterização bioquímica das lipases presentes em frutos de dendê são fundamentais para se entender o processo de acidificação do óleo e, a partir desse entendimento, propor métodos alternativos mais eficazes e de baixo custo para a inibição ou extinção da ação dessas enzimas. Os métodos conhecidos atualmente para evitar a ação de lipases envolvem: 1) imersão dos frutos em soluções aquosas a pH 10; 2) imersão dos frutos em solução salina; 3) imersão em solução de sorbato de potássio; 4) autoclavagem, que é o método industrial para preparo da extração do óleo e que ocorre a 140 °C e 3 ATM de pressão por 60 minutos; 5) tratamento com vapor; 6) pasteurização a 85 °C (Cavalcanti-Oliveira et al., 2015). Esses métodos visam a manutenção da qualidade do óleo para consumo humano (< 5% de acidez), além de torná-lo mais adequado para a produção de biocombustível.

O isolamento das lipases endógenas presentes no mesocarpo dos frutos de dendê é um grande desafio, pois essas enzimas estão localizadas em uma estrutura complexa e de difícil acesso, que são as membranas que constituem os corpos de óleo (Bhatla et al., 2009). Além disso, em algumas amostras de fruto de dendê, as lipases encontram-se em concentração muito baixa (Morcillo et al., 2013) e ainda podem ser inativadas durante o processo de extração, visto que são instáveis na ausência de ambiente apolar. As lipases também podem ser fortemente inibidas pelos ácidos graxos presentes nas amostras, dificultando a sua detecção (Henderson; Osborne, 1991; Sambanthamurthi et al., 2000).

Em alguns estudos, a caracterização das lipases tem sido realizada diretamente na matriz em que essas enzimas se encontram, ou seja, na polpa macerada de mesocarpo. Entretanto, esse meio contém uma série de compostos como, por exemplo, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, entre outros, que podem interferir na análise dos produtos da reação e na determinação das propriedades intrínsecas da enzima (Bourgis et al., 2011; Neoh et al., 2013). Para a determinação das propriedades da lipase dos frutos de dendê de forma mais precisa e exata, é importante que ela seja isolada, ainda que parcialmente, dos demais componentes do mesocarpo. Dependendo do grau de pureza da lipase, que pode variar desde a utilização da polpa macerada de mesocarpo até a lipase com máximo grau de pureza, as propriedades dessas enzimas podem apresentar variações. Além disso, há diferentes lipases em um mesmo fruto de dendê, e os dados obtidos podem também variar, dependendo da lipase que está em maior concentração, ou apresentar maior atividade catalítica para o substrato modelo utilizado nos ensaios.

Considerando todos os aspectos descritos acima, são esperados e observados dados divergentes das propriedades de lipases de frutos de dendê descritas na literatura científica, por exemplo, um estudo em que as lipases presentes em fruto de dendê são ativas em temperaturas em torno de 5 °C foi relatado, enquanto outro estudo afirma que essas lipases são facilmente inativadas a 8 °C (Henderson; Osborne, 1991; Sambanthamurthi et al., 2000; Cadena et al., 2013).

Quanto às condições ótimas de pH e temperatura em que as lipases do fruto de dendê atuam, também há uma ampla faixa de dados relatados. Quanto aos valores de pH descritos, tem-se: 4,5 (Abigor et al., 1985), 7,5

(Sambanthamurthi et al., 2000) e 9,0 (Ebongue et al., 2006). Quanto à temperatura, as lipases descritas atuam em uma faixa de temperatura de 18-45 °C (Abigor et al., 1985; Cadena et al., 2013).

Neste estudo, foram avaliadas as atividades lipolíticas utilizando polpa macerada de mesocarpo (PM) e o extrato proteico (EP) obtido a partir dela. Os produtos da reação enzimática utilizando PM ou EP foram analisados por dois métodos diferentes: titulométrico e cromatográfico.

Material e Métodos

Coleta, lavagem, inativação e armazenamento dos frutos de dendê

Os frutos utilizados neste estudo foram gentilmente doados pela Embrapa Cerrados e coletados da cultivar *Elaeis guineensis* BRS C2501.

Após a coleta do cacho inteiro no campo, algumas espiguetas foram retiradas e levadas imediatamente para o laboratório onde foram quimicamente esterilizadas. Para a esterilização, os frutos foram retirados manualmente das espiguetas e em seguida foram lavados com hipoclorito de sódio (11% v/v) por 2 minutos, etanol 70% m/v por 1,5 minuto e água estéril por 1 minuto, sendo esta última etapa repetida três vezes. Esse tratamento foi necessário para evitar a contaminação dos experimentos por microrganismos ou enzimas externas ao fruto. Uma parte dos frutos com as superfícies esterilizadas foi imediatamente congelada a -20 °C e mantida assim até o uso, enquanto outra parte foi submetida a cozimento a 140 °C por uma hora em reator de alta pressão (Parr) a fim de inativar todas as lipases presentes na amostra, gerando assim amostras inativadas. Os frutos inativados foram mantidos congelados a -20 °C até o uso.

Preparo da polpa macerada de mesocarpo

Para o preparo da polpa macerada de mesocarpo, os frutos esterilizados (ativos ou inativados) foram descascados, e o mesocarpo foi retirado do fruto com o auxílio de um bisturi. Os pedaços de mesocarpo foram macerados

com utilização de almofariz e pistão e, em seguida, processados por meio de agitação mecânica em agitador mecânico do tipo túrrax.

Preparo de emulsões e ensaio titulométrico

Para os ensaios de hidrólise enzimática utilizando óleo de oliva ou óleo de dendê refinado (fornecido pela Denpasa) como substrato, foi preparada uma emulsão contendo 6,48 g do óleo, 11,5 g de água destilada e 3,38 g de goma arábica. A mistura foi agitada com agitador mecânico (túrrax) até adquirir aspecto homogêneo. Em seguida, a emulsão foi transferida para o reator e o pH dessa emulsão foi ajustado diretamente no titulador automático. Imediatamente após o ajuste de pH, a solução contendo lipase também foi adicionada ao reator de vidro encamisado, e o comando para iniciar a titulação dos ácidos liberados na reação foi manualmente acionado no software Tiamo.

A solução contendo lipases foi a polpa macerada de mesocarpo ativa (que não foi inativada termicamente em reator Parr), o extrato proteico de mesocarpo ou a solução da lipase comercial. Quando o óleo de dendê refinado foi substituído pela polpa macerada de mesocarpo ativa, durante o preparo da emulsão, duas abordagens foram utilizadas: 1) nenhuma solução de enzima foi adicionada ao reator e a titulação foi manualmente iniciada após o ajuste de pH da emulsão; 2) solução de lipase comercial foi adicionada ao reator e, somente após essa adição, a titulação dos ácidos formados foi iniciada. Quando foi utilizada como substrato a polpa macerada de mesocarpo inativada, ou seja, a amostra tratada termicamente em reator Parr a 140 °C para inativação das lipases, nenhuma solução de enzima foi adicionada ao reator, e a titulação foi manualmente iniciada após o ajuste de pH da emulsão. Os diferentes ensaios titulométricos foram realizados a 25 °C, 35 °C ou 50 °C e em valores de pH que variaram de 5 a 10, dependendo da resposta de interesse para um determinado ensaio. A quantidade de ácido liberada em cada ensaio de hidrólise enzimática foi quantificada em titulador automático utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 20 mM como solução titulante e o sistema reacional foi mantido sob agitação magnética (Ebongue et al., 2006). A quantidade de atividade de lipase é diretamente proporcional à quantidade de hidróxido de sódio necessária para neutralizar os ácidos graxos liberados durante a hidrólise, mantendo assim o pH do meio constante. Dessa maneira, uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima

capaz de consumir 1 μmol de hidróxido de sódio (que equivale 1 μmol de ácido graxo liberado) por minuto nas condições operacionais estabelecidas para o ensaio.

Ensaio titulométrico utilizando somente a polpa macerada de mesocarpo

Além de realizar a hidrólise enzimática do óleo presente no mesocarpo em um meio emulsificado, visando aumentar a taxa de hidrólise, também foram realizados ensaios de titulação direta da polpa macerada de mesocarpo, ou seja, sem o preparo de uma emulsão, visando avaliar a ação das enzimas em um ambiente o mais próximo possível do ambiente natural destas.

A polpa macerada de mesocarpo foi preparada como descrito no item “Preparo da polpa macerada de mesocarpo”. E a titulação foi realizada como descrito no item “Preparo de emulsões e ensaio titulométrico”, com ou sem a adição de lipase comercial. Os ensaios também foram realizados em diferentes condições de pH e com temperatura de 35 °C. A lipase comercial utilizada neste estudo foi o produto comercial da marca Sigma Aldrich (código 534641-10), Amano Lipase PS, de *Burkholderia cepacia* $\geq 30,000$ U/g, pH 7, 50 °C (pH e temperatura ótima).

Análise cromatográfica de ácidos graxos

Amostras obtidas a partir dos ensaios de hidrólise em titulador automático foram preparadas para a análise em cromatógrafo a líquido seguindo as etapas: 1) alíquotas de 1,5 mL do meio reacional foram transferidas para microtubos com capacidade para 1,5 mL e submetidas a secagem em speed-vac por 4 horas a 40 °C, 2) foi adicionado à amostra seca 1 mL de isopropanol:hexano (5:4), e os tubos foram agitados a 40 rpm por 30 minutos, 3) os microtubos contendo as amostras em solvente orgânico foram centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm, e os sobrenadantes foram transferidos para frascos tipo *vials*. Para a análise cromatográfica, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida ACQUITY UPLC® H-class da Waters composto de um Gerenciador Quaternário de Solvente, Gerenciador de Amostras, Gerenciador de Coluna com uma coluna UPLC® HSS C18, e um Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz (ELSD), todos controlados pelo softwa-

re Empower® 2. A coluna foi mantida a 40 °C, enquanto o gradiente de água, acetonitrila, 2-propanol e n-hexano foi mantido a uma vazão de 0,7 ml/min (Nakai et al., 2019).

Fracionamento dos componentes do mesocarpo para avaliar atividade lipolítica

Visando a remoção de estruturas do mesocarpo que não contêm lipases (fibras e água, por exemplo), as quais poderiam interferir na análise da ação dessas enzimas, foi realizado o procedimento descrito a seguir. Após a maceração do mesocarpo, foi preparada uma polpa macerada em tampão Tris-HCl 2,0 mM, pH 7, contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 10 mM na razão de 1 g de mesocarpo para 1 mL de tampão. A polpa macerada produzida foi dividida em duas partes e, em uma delas, foi adicionada lipase comercial para servir de controle positivo para as reações. Cada uma das polpas maceradas geradas (aditivada e não aditivada com lipase comercial) foi ultracentrifugada por 60 minutos, a 30.000 rpm e 30 °C. As frações geradas em cada amostra – óleo, borra (pellets), água e fibras – foram avaliadas quanto à atividade lipolítica em titulador automático como descrito anteriormente.

Resultados e Discussão

Para avaliar a atividade de lipase em frutos de dendê, alguns parâmetros de análise foram variados, como, por exemplo, o pH e o tempo de reação, o tipo e a forma como o substrato foi preparado para a análise. O principal método utilizado para medir a ação de lipases nesse estudo foi o método titulométrico. A fim de comprovar a ação das enzimas, foram realizadas análises por meio da espectrometria de massa e cromatografia líquida para algumas amostras. As análises por meio de espectrometria de massa foram publicadas por Macêdo et al. (2016) e serão apenas discutidas neste trabalho. Testes de extração de lipases a partir do mesocarpo também foram realizados, visando também a confirmação da ação dessas enzimas. Os resultados obtidos e a discussão referente a esses testes serão apresentados nos tópicos a seguir.

Efeito do pH sobre a ação de lipases na hidrólise de óleo de dendê

O efeito do pH sobre a ação de lipases durante a hidrólise do óleo de dendê foi avaliado em tempos curtos (15 minutos) e tempos longos (~ 4 horas) de reação. Além disso, os substratos utilizados nessa etapa do estudo foram o óleo de dendê refinado e a polpa macerada de dendê ativa, sendo esta última utilizada pura ou como componente de uma emulsão.

Inicialmente, foi avaliada a ação de lipases em curtos intervalos de tempo (15 minutos), visto que é uma exigência para que o valor medido seja considerado “atividade lipolítica” ou, em outras palavras, “velocidade inicial da reação catalisada pela lipase”. O ensaio de hidrólise para determinação da atividade enzimática deve apresentar excesso de substrato e baixa concentração de produtos, o que geralmente é observado em curtos intervalos de tempo. Os primeiros ensaios de hidrólise foram realizados a pH 7,0 por três motivos: 1) alguns estudos anteriores indicam que o pH ótimo para a ação de lipases do fruto de dendê é o pH 7,0; 2) os ácidos graxos liberados durante a hidrólise do óleo de dendê encontram-se desprotonados em pH 7, isso aumenta a sensibilidade do método titulométrico e; 3) a lipase comercial utilizada nos ensaios como uma enzima de referência para validar o método utilizado na análise apresenta melhor desempenho de hidrólise em pH 7,0. A Tabela 1 apresenta dados da velocidade de liberação de ácido (quarta coluna) quando diferentes condições operacionais são utilizadas.

Tabela 1. Taxa de liberação de ácidos graxos medidos em titulador automático após 15 minutos de reação em pH 7,0 e diferentes condições operacionais. Os substratos (óleo de dendê refinado e polpa macerada de mesocarpo ativa) foram utilizados em meio emulsificado, e os ensaios foram realizados a pH 7,0 e 40 °C.

Nº da Linha	Lipase comercial (mg)	Substrato	Velocidade de liberação de ácido ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
1	Sem adição	Óleo de dendê	0,08 \pm 0,0
2	2,09	Óleo de dendê	14,49 \pm 0,3
3	4,18	Óleo de dendê	14,58 \pm 0,3
4	Sem adição	Polpa macerada de dendê	0,75 \pm 0,3

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Nº da Linha	Lipase comercial (mg)	Substrato	Velocidade de liberação de ácido ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
5	16,00	Polpa macerada de dendê	$13,04 \pm 0,6$
6	8,00	Polpa macerada de dendê	$11,88 \pm 0,8$
7	16,00	Polpa macerada de dendê	$14,01 \pm 0,1$
8	24,00	Polpa macerada de dendê	$13,51 \pm 0,7$
9	32,00	Polpa macerada de dendê	$14,74 \pm 0,8$

Os dados de velocidade de liberação de ácidos ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$) apresentados na Tabela 1 podem ser convertidos em valores de atividade enzimática se forem divididos pela quantidade de preparação enzimática utilizada no ensaio (mg do pó liofilizado da enzima comercial ou g da polpa macerada de mesocarpo). Nesse ensaio foram utilizados 6,38 g da polpa macerada de mesocarpo, e as quantidades da lipase comercial são apresentadas na Tabela 1. Para facilitar a discussão, os dados foram apresentados apenas como velocidade de ácido liberada no ensaio.

A primeira observação é que, nos ensaios em que a lipase comercial não é adicionada (linhas 1 e 4, da Tabela 1), a velocidade de liberação de ácidos é praticamente nula quando óleo de dendê refinado é utilizado como substrato, enquanto um valor de velocidade ligeiramente maior é observado para a polpa macerada de mesocarpo ativa. Essa é a primeira indicação da presença de enzima ativa na polpa macerada de mesocarpo, pois a ausência dessas enzimas poderia levar a valores similares, e próximos a zero, de velocidade nos ensaios de hidrólise apresentados nas linhas 1 e 4 da Tabela 1. Por outro lado, contaminantes na polpa macerada de mesocarpo podem ter causado a maior taxa de acidificação nesse meio reacional, e outros testes de hidrólise são necessários para comprovar a presença de lipases ativas.

A adição de lipase comercial aos ensaios de hidrólise levou a um significativo aumento na velocidade de liberação de ácidos (linhas 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9 da Tabela 1) em comparação aos ensaios sem a adição dessa enzima

(linhas 1 e 4 da Tabela 1). Entretanto, não foi observada variação significativa da velocidade quando a lipase comercial foi aplicada em diferentes quantidades, tanto para ensaios realizados com óleo de dendê refinado quanto para ensaios de hidrólise realizados com polpa macerada de mesocarpo ativa. Isso pode ter ocorrido devido às definições estabelecidas para o ensaio de hidrólise, por exemplo, a quantidade de enzima pode estar em excesso a partir de 2,09 mg para este sistema reacional, ou a taxa máxima de adição da solução de hidróxido de sódio pode ter sido atingida quando a concentração de hidróxido utilizada é de 20 mM. Como o foco deste trabalho é detectar a ação de lipases do fruto de dendê, o problema observado para os ensaios com a enzima comercial não foram explorados, pois o fato de a presença da lipase comercial aumentar significativamente a taxa de liberação de ácido já é suficiente para concluir que, se houver enzima ativa em uma amostra, ela será detectada pelo método.

Como a velocidade de liberação de ácido a partir da polpa macerada de mesocarpo ativa foi muito baixa nas condições avaliadas na Tabela 1, a temperatura do ensaio foi aumentada para 50 °C, e diferentes valores de pH foram investigados nos próximos ensaios de hidrólise. Além disso, foram realizados experimentos controle com a polpa macerada de dendê inativada. Os resultados para esse teste estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de liberação de ácido medida em titulador automático após 15 minutos de reação em diferentes valores de pH e sem a adição de lipase comercial. O substrato utilizado foi a polpa macerada de mesocarpo (ativa e inativada) em meio emulsificado, e os ensaios foram realizados a 50 °C.

Nº da Linha	pH	Substrato (Polpa macerada de Dendê)	Velocidade de liberação de ácido ($\mu\text{mol/min}$)
1	5,0	Ativa	$0,00 \pm 0,0$
2	5,0	Inativada	$0,00 \pm 0,0$
3	6,0	Ativa	$0,58 \pm 0,0$
4	6,0	Inativada	$11,50 \pm 0,4$
5	7,0	Ativa	$4,41 \pm 3,4$
6	7,0	Inativada	$14,45 \pm 0,8$
7	8,0	Ativa	$2,38 \pm 0,5$

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Nº da Linha	pH	Substrato (Polpa macerada de Dendê)	Velocidade de liberação de ácido ($\mu\text{mol/min}$)
8	8,0	Inativada	$13,46 \pm 2,2$
9	9,0	Ativa	$2,99 \pm 0,4$
10	9,0	Inativada	$13,63 \pm 2,3$
11	10,0	Ativa	$3,16 \pm 0,2$
12	10,0	Inativada	$14,90 \pm 0,0$

Com exceção dos ensaios realizados em pH 5,0, os quais apresentaram velocidade de liberação de ácido igual a zero (linhas 1 e 2 da Tabela 2), os ensaios de hidrólise, independentemente do valor de pH, apresentaram maior velocidade de liberação de ácidos para a polpa macerada de dendê inativada do que para o respectivo ensaio utilizando a polpa macerada de dendê ativa. Tombs e Stubbs (1982) também observaram esse efeito e atribuíram isso à transferência dos ácidos graxos da fase lipídica para a fase aquosa.

É possível que o cozimento dos frutos fragilize a estrutura química dos componentes do mesocarpo, tornando a transferência de ácidos graxos pré-existentes ao ensaio de hidrólise mais fácil do que em frutos que não foram cozidos. Esse comportamento é observado somente em curtos intervalos de reação (< 30 minutos), pois a velocidade de liberação de ácido observada em polpas maceradas de mesocarpo inativadas é sensivelmente reduzida ao longo do tempo, enquanto a velocidade observada para polpas maceradas ativas permanece igual, tornando-se superior à das amostras inativadas em longos tempos de reação (Figura 1).

Os dados apresentados na Figura 1 começaram a ser monitorados após 30 minutos de reação, para garantir que a velocidade de liberação de ácidos na polpa macerada de dendê ativa (ação de lipases) fosse maior que a velocidade de liberação de ácidos na polpa macerada de dendê inativada (ácidos graxos pré-existentes ao ensaio de hidrólise). Os dados dessa reação foram monitorados por mais 30 minutos.

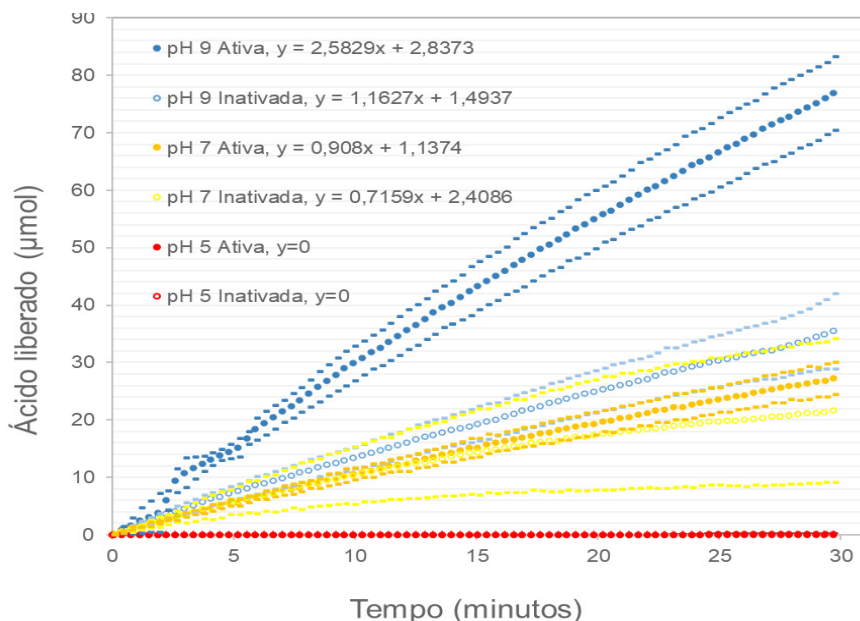


Figura 1. Ácidos graxos liberados quando polpas maceradas de dendê ativas (círculos cheios) e inativadas (círculos vazios) foram utilizadas como substratos. Os ensaios foram realizados em valores de pH 5 (gráficos vermelhos), pH 7 (gráficos amarelos) e pH 9 (gráficos azuis) em meios reacionais emulsificados. Os traços nas respectivas cores dos círculos indicam os valores da média \pm desvio padrão.

Apesar de apresentarem desvios relativamente grandes, os dados apresentados na Figura 1 indicam uma tendência de aumento na velocidade de liberação de ácido com o aumento de pH, em uma faixa de 5 a 9, no intervalo de reação de 30 a 60 minutos. Já no intervalo de 0 a 15 minutos (dados da Tabela 2) essa velocidade aumenta em valores de pH de 5 a 7 e depois diminui e permanece em um patamar inferior em valores de pH de 8 a 10. Essas inversões que ocorrem nos perfis de hidrólise da polpa macerada de dendê em função do tempo e dos valores de pH podem ser causadas por diferentes fatores, entre eles a interferência de ácidos graxos pré-existentes ao ensaio, propriedades das lipases presentes em mesocarpo de dendê e limitações do método analítico.

A hidrólise da polpa macerada de dendê ativa também foi realizada diretamente em titulador automático, ou seja, sem o preparo de uma emulsão.

Esse ensaio foi realizado em diferentes valores de pH e por um período de 180 minutos (Figura 2).

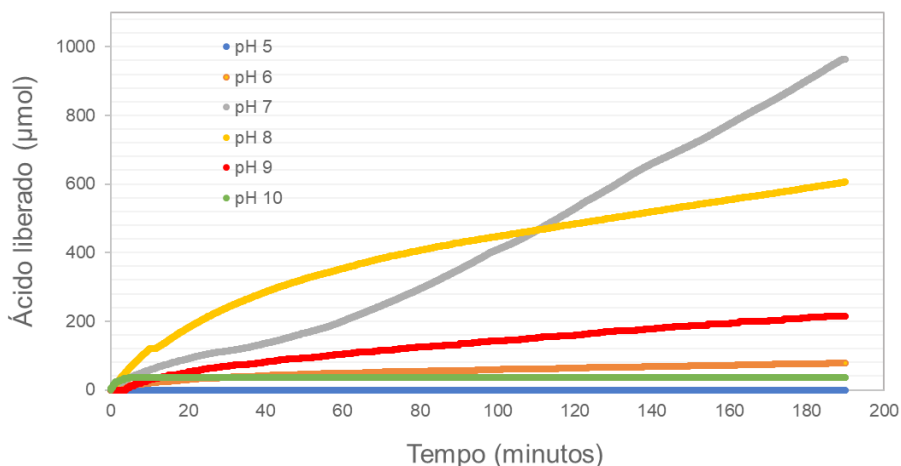


Figura 2. Concentração de ácidos graxos liberados quando polpa macerada de dendê ativa foi utilizada como substrato. A solução titulante nesse ensaio foi hidróxido de sódio 100 mM.

O uso da polpa macerada de mesocarpo pura no ensaio de hidrólise enzimática é interessante porque reproduz um ambiente muito parecido com o ambiente natural em que as lipases atuam. Além disso, a concentração de óleo e de lipases do dendê no meio reacional é maior, visto que a polpa macerada de mesocarpo não é diluída em água e goma arábica. Por outro lado, a formação da emulsão facilitaria o acesso da enzima ao substrato, por promover maior dispersão do óleo na água.

A velocidade de liberação de ácido quando utilizada a polpa macerada de mesocarpo pura no ensaio de hidrólise foi muito maior que aquela observada no meio emulsificado, e a solução titulante (hidróxido de sódio) precisou ter sua concentração aumentada de 20 mM para 100 mM para que o pH pudessem ser mantido durante a reação de hidrólise.

Nos dados apresentados na Tabela 2, a comparação entre as velocidade de liberação de ácido na polpa macerada de dendê ativa indica que o pH 7 é o valor de pH em que as lipases de dendê apresentam melhor desempenho de hidrólise. Entretanto, esse ensaio foi realizado em 15 minutos e nesse

período foi observada uma forte interferência dos ácidos pré-existentes na polpa macerada. Os valores de velocidade de liberação de ácidos (aparente) na polpa macerada de dendê inativada foram muito superiores àqueles observados para a polpa macerada ativa. Optou-se, então, por iniciar a medida de ácidos liberados apenas após 30 minutos de reação, pois dessa forma a velocidade de liberação de ácidos na polpa macerada de dendê ativa se tornava superior à da polpa macerada de dendê inativada. Dessa maneira, foi observado a partir dos dados da Figura 1 que o pH 9 parecia ser o valor de pH em que as lipases de dendê apresentavam melhor desempenho de hidrólise. Mas, ao se realizar o ensaio de hidrólise utilizando polpa macerada de dendê ativa pura, novos perfis de hidrólise foram observados.

Os gráficos da Figura 2 indicam que, até aproximadamente 120 minutos, o valor de pH 8 leva a um melhor desempenho de hidrólise pelas lipases e, a partir desse intervalo de tempo, o pH 7 passa a ser o melhor pH para a ação dessas enzimas. A variação dos perfis considerando os dados das Figuras 1 e 2 pode ser justificada até 120 minutos de reação, pelo fato de um meio ser emulsificado e o outro não. Então há uma incerteza entre os valores de pH 7, 8 e 9, para o pH ótimo da ação de lipases de dendê. Entretanto, em um intervalo de tempo muito longo, maior que 120 minutos, o valor de pH 7 parece ser o valor mais adequado para o máximo desempenho das lipases de dendê. Isso pode estar relacionado à estabilidade dessas enzimas frente a diferentes valores de pH. É possível que essas enzimas apresentem elevado potencial de hidrólise em valores de pH mais elevado (8 e 9). Entretanto, podem apresentar baixa estabilidade em condições mais alcalinas e, assim, a elevada velocidade de hidrólise só se observa em curtos intervalos de tempo. Vale ressaltar que a ação dessas enzimas não pode ser bem avaliada pelo método titulométrico em pH 5, porque a maioria dos ácidos a serem quantificados se encontram pouco dissociados nesse valor de pH. Portanto, conclui-se que a determinação do pH ótimo de lipases de dendê sobre a hidrólise do óleo presente na polpa macerada pode ser fortemente mascarada em função do tempo de reação, da forma como o substrato é preparado, do grau de pureza da enzima analisada e do método de análise utilizado para quantificar os produtos da reação.

Para verificar se de fato ocorre a liberação de ácidos graxos em ensaios de hidrólise realizados a pH 5, foi feita análise cromatográfica dos produtos

de hidrólise obtidos nos ensaios anteriores. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3. Análise cromatográfica de ácidos graxos liberados pela ação de lipases em polpa macerada de mesocarpo de dendê após 60 minutos do ensaio de hidrólise.

pH do ensaio	Polpa macerada de mesocarpo	Ácido linoleico (µg)	Ácido palmítico (µg)	Ácido oleico (µg)	Ácido esteárico (µg)
5	Inativada	0,038	0,047	0,158	0,131
	Ativa	0,235 ± 0,06	0,883 ± 0,21	1,044 ± 0,26	0,114 ± 0,03
7	Inativada	ND	ND	0,304	ND
	Ativa	0,178 ± 0,05	0,105 ± 0,01	0,749 ± 0,16	ND
9	Inativada	ND	ND	0,261	ND
	Ativa	0,052 ± 0,09	ND	0,331 ± 0,22	ND

Os dados da Tabela 3 indicam um novo perfil para o desempenho da(s) lipase(s) de fruto de dendê em função do pH. Os dados cromatográficos apontam o pH 5 como uma condição operacional ótima para a ação da(s) lipase(s).

Sabe-se que após a colheita dos frutos de dendê inicia-se uma rápida acidificação do óleo, e esta acidificação ocorre naturalmente a pH 5. Isso foi evidenciado neste estudo quando alguns frutos, após sua esterilização superficial, foram deixados na bancada a temperatura ambiente e, em intervalos de 24 horas, amostras de frutos foram utilizadas para o preparo da polpa macerada de mesocarpo. Em seguida, o pH da polpa macerada era medido. Após 5 dias de monitoramento, que é um tempo suficiente para uma extensa acidificação do óleo, o pH da polpa macerada variou de 4,8 a 5,5. Isso significa que as lipases que causam a acidificação funcionam a pH 5 e, segundo os dados apresentados na Tabela 3, esse é o valor de pH em que essas enzimas apresentam seu melhor desempenho. Apesar de o pH 5 permitir o máximo desempenho da(s) lipase(s), os próximos ensaios de hidrólise foram realizados a pH 7 ou 9, visto que as análises cromatográficas não podem ser realizadas diariamente, assim como as análises titulométricas, devido à maior complexidade desse método.

Dados da literatura indicam valores de pH ótimo de 4,5 a 9,0 para as lipases de mesocarpo de dendê, e alguns desses estudos usaram o método titulométrico para essa determinação, o que pode ter levado a valores superestimados em relação ao valor exato desse parâmetro.

Nas etapas seguintes desse estudo, foi avaliado o isolamento da(s) lipase(s) a partir do mesocarpo de dendê, visando eliminar/reduzir os interferentes da amostra, como, por exemplo, os ácidos graxos pré-existentes ou outros ácidos da amostra.

Isolamento de lipase(s) a partir de mesocarpo de dendê

Três estratégias para o isolamento da(s) lipase(s) dos frutos de dendê foram utilizadas visando, principalmente, a eliminação/redução de interferentes. Além disso, o uso de lipase(s) em maior concentração nos ensaios, o que só é possível com enzimas parcialmente purificadas, também pode reduzir o tempo de análise e propiciar maior precisão na determinação dos produtos. Os itens a seguir descrevem as estratégias utilizadas para o isolamento de lipase(s) do fruto de dendê.

Fracionamento dos componentes do mesocarpo por meio de ultracentrifugação

O mesocarpo de dendê não é um material uniforme, e as lipases endógenas não estão distribuídas em todas as partes desse material. Essas enzimas são, junto com outras proteínas, os constituintes de uma membrana que envolve uma pequena gota de óleo, formando uma estrutura chamada corpo de óleo. É esperado que ao separar os corpos de óleo das demais frações do mesocarpo (água e fibras), seja obtida uma fração rica em lipases, e a atividade nessa fração talvez seja mais facilmente detectada.

Nessa etapa do estudo, uma estratégia de fracionamento utilizando ultracentrífuga foi adotada para aumentar a concentração da(s) lipase(s) em amostras de mesocarpo. Após a ultracentrifugação, quatro frações foram obtidas: óleo, borra, água e fibras (Figura 3).

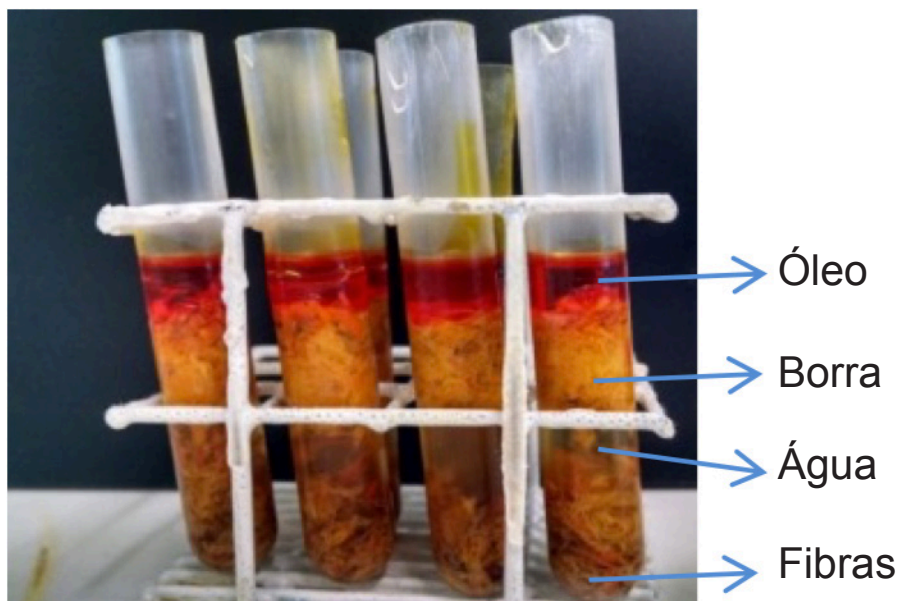


Figura 3. Ilustração das frações obtidas após ultracentrifugação da polpa macerada de mesocarpo por 60 minutos, a 30.000 rpm e 30 °C.

Nos ensaios de hidrólise utilizando azeite de oliva como substrato, 1 mL da amostra contendo a enzima foi adicionado ao reator. Ao realizar a análise da polpa macerada de mesocarpo, 1 mL de amostra contendo todas as frações era adicionado, e sabendo-se que somente uma ou duas das quatro frações dessa polpa macerada contém a(s) lipase(s), essas enzimas estavam diluídas na amostra analisada. Entretanto, ao adicionar 1 mL de uma fração isolada, por exemplo, à fração oleosa que contém a(s) lipase(s), uma maior quantidade de enzima é adicionada ao ensaio. Essa forma de análise apresenta duas vantagens: reduz a quantidade de interferentes e aumenta a precisão do método, pois concentrações maiores do produto são observadas no meio reacional. Ainda no ensaio de hidrólise de azeite de oliva, uma amostra da polpa macerada de mesocarpo ativa foi dopada com lipase comercial, antes da ultracentrifugação, e esse ensaio foi utilizado como um controle positivo do experimento. Os valores de atividade medidos com as frações obtidas de polpas maceradas dopadas e não dopadas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade de lipase nos diferentes componentes de mesocarpo, medidas a 50 °C e pH 7, avaliando o aumento da sensibilidade do método.

Polpa macerada de mesocarpo	Amostra	Atividade (U/g de amostra)
Não dopada	Óleo	3,76
	Borra	2,49
	Água	ND ⁽¹⁾
	Fibras	ND
Dopada	Óleo	1,22
	Borra	5,40
	Água	ND
	Fibras	ND

⁽¹⁾ ND = não detectada.

A partir dos dados da Tabela 4, observou-se que amostras dopadas e não dopadas apresentaram atividades nas frações contendo óleo e borra. Notou-se também que a atividade na fração oleosa de amostras não dopadas foi superior à de amostras dopadas. Este é um resultado inesperado e que pode ter ocorrido devido a uma falha no sistema de medida dos produtos durante o ensaio de hidrólise. Já para a borra, o resultado esperado foi observado, ou seja, a atividade dessa fração quando a amostra foi dopada com enzima comercial aumentou.

As análises das atividades de lipases em amostras de mesocarpo de dendê poderiam ser realizadas pela homogeneização das frações de óleo e borra, desprezando as fibras e água, pois esse é um método simples e rápido para o aumento da concentração da lipase nas amostras e que não causa a inativação das enzimas. Entretanto, outras tentativas de isolamento das lipases foram estudadas, a fim de obter frações das enzimas livres de óleo, permitindo assim maior controle do ensaio de hidrólise.

Isolamento de lipases em frutos de dendê por meio de hidrólise enzimática e tratamento do hidrolisado com heptano e isopropanol

Nesta etapa do estudo, foi investigado o isolamento da(s) lipase(s) de frutos de dendê por meio da homogeneização de todas as frações presentes no mesocarpo, exceto as fibras. A primeira etapa da homogeneização foi o preparo da polpa macerada de mesocarpo utilizando água em uma razão de 1:2, ou seja, para cada 1 g de mesocarpo, 2 g de água foram adicionados ao preparo da polpa macerada. A fim de esgotar todo o substrato (óleo de dendê) presente nessa amostra, lipase comercial na forma imobilizada foi utilizada para realizar a hidrólise quase completa desse óleo em reator acoplado ao titulador automático a pH 7 e 37 °C. A forma imobilizada da lipase permitiu sua retirada do meio reacional ao final da hidrólise. A reação foi mantida até que não houvesse a adição da solução titulante, ou seja, a reação já havia atingido o equilíbrio, o que ocorreu após 40 horas do início da reação de hidrólise. A hidrólise enzimática quase completa do óleo presente na polpa macerada de mesocarpo resultou em uma amostra de aspecto mais homogêneo (Figura 4A).

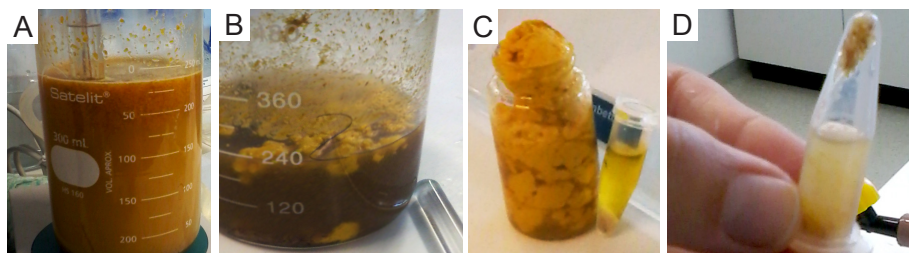


Figura 4. Ilustrações das etapas do isolamento de lipase: (A) meio reacional após 40 horas de hidrólise; (B) meio reacional após adição de heptano; (C) fração insolúvel da mistura heptano-água do meio reacional (tubo de cristalografia à esquerda) e dissolução dessa fração em isopropanol (microtubo à direita); (D) fibras e fração aquosa obtida no tratamento com solventes.

Para separar as frações que não continham lipases (água e fibras) da polpa macerada de mesocarpo hidrolisada, foi adicionado a esta o solvente heptano, que levou à separação de três fases (Figura 4B), sendo a fração mais leve uma polpa macerada semelhante a manteiga (Figura 4C), a fração aquosa (topo do microtubo na Figura 4D) e as fibras (fundo do microtubo na

Figura 4D). A água e as fibras foram descartadas, visto que ensaios anteriores comprovaram que não há atividade lipolítica nessas frações.

A polpa macerada amarela obtida foi recolhida em um tubo de cintilografia (imagem à esquerda da Figura 4C), e uma parte dela foi solubilizada em isopropanol (microtubo à direita da Figura 4C). O isopropanol é um dos solventes utilizados para a precipitação de enzimas sem causar grandes perdas de atividade catalítica. Assim, ao solubilizar a polpa macerada amarela em isopropanol, percebe-se a precipitação de uma massa branca no fundo do microtubo da Figura 4C. Essa massa é constituída pelas proteínas que permaneceram na fase hidrofóbica desse processo de separação, ou seja, as lipases e outras proteínas com afinidade hidrofóbica, enquanto as proteínas hidrossolúveis foram removidas na fase aquosa.

As proteínas precipitadas a partir da polpa macerada amarela em isopropanol não apresentaram atividade lipolítica. Também não foram detectadas atividades lipolíticas nas demais frações geradas neste experimento, provavelmente, devido à inativação da enzima durante o processo de isolamento. Uma alternativa para esse processo de separação seria a adição direta de isopropanol à polpa macerada de dendê hidrolisada (Figura 4A), precipitando todas as proteínas presentes em mesocarpo de dendê, visto que esta coprecipitação poderia reduzir a taxa de inativação das lipases e reduziria o número de etapas e de solvente orgânico gasto no isolamento de lipases.

No estudo de isolamento realizado por Sambanthamurthi et al. (2000), foi verificada a ocorrência de inativação da(s) lipase(s) de dendê quando expostas a meios hidrofílicos sem a presença de superfícies hidrofóbicas.

A agitação mecânica utilizada durante o preparo da polpa macerada de mesocarpo pode causar a ruptura das membranas dos corpos de óleo, liberando as lipases para a interação com o óleo. Na polpa macerada de mesocarpo, provavelmente, as lipases ficam aderidas às superfícies das gotículas de óleo e, quando a hidrólise quase completa desse óleo é realizada e a fração hidrofóbica gerada é solubilizada em isopropanol, é possível que as lipases percam esse ambiente hidrofóbico e inativem. Entretanto, se esse procedimento fosse realizado na presença de superfícies hidrofóbicas (que não fosse óleo), por exemplo, carvão ativado, ou outro suporte hidrofóbico adsorvente, poderia ser atingida elevada recuperação de lipase na forma ativa.

No estudo realizado por Macêdo et al. (2016), amostras de frutos de dendê da variedade BRS C2501, as mesmas utilizadas neste estudo, foram utilizadas a fim de isolar lipases por meio de um método descrito por Abigor et al. (1985), o qual faz uso de tampões e éter para fracionar componentes do mesocarpo e isolar a lipase a partir da fração insolúvel em éter.

Macêdo et al. (2016) verificaram que a(s) lipase(s) parcialmente purificadas usando o método descrito por Abigor et al. (1985) apresentaram atividade catalítica quando óleo de dendê refinado foi utilizado como substrato e a hidrólise foi realizada a 37 °C e pH 7. Os produtos desse ensaio de hidrólise foram analisados por espectrometria de massa por injeção direta (DIMS - *Direct Infusion Mass Spectrometry*) em um espectrômetro de massas Ion Trap (LTQ XL, Thermo Fisher Scientific). Os resultados indicaram a presença de novos compostos com massas moleculares menores após a reação de hidrólise. Também foi verificada a diminuição na intensidade dos compostos de alta massa molecular após a reação. Apesar da necessidade de identificação dos compostos químicos determinados por espectrometria de massa, os resultados discutidos nos itens anteriores deste estudo fortalecem a hipótese de que, de fato, a hidrólise do óleo ocorre pela ação de lipases.

Conclusões

O óleo em frutos de dendê da cultivar *Elaeis guineensis* BRS 2501 sofre hidrólise causada por lipase(s). O valor médio do pH no mesocarpo de frutos de dendê é aproximadamente 5 e, neste valor de pH, pelo menos uma das lipases presentes no fruto apresenta desempenho máximo de hidrólise. A determinação do pH ótimo de lipases diretamente na polpa macerada de mesocarpo é fortemente influenciado pelo tempo de reação, tipo e modo de preparo do substrato, assim como é influenciado pelo método de análise dos produtos, entre outros fatores. O isolamento de lipase ativa a partir de mesocarpo do fruto de dendê pode ser realizada por meio do método descrito por Abigor et al. (1985).

A conclusão de que a acidificação dos frutos de dendê é causada por lipases é importante para direcionar outras etapas de estudo que irão buscar soluções para esse problema, garantindo assim a melhor qualidade do óleo e, consequentemente, maior aproveitamento desse óleo na indústria,

impactando positivamente a cadeia produtiva. Estudos visando o bloqueio da expressão dessas enzimas nos frutos podem ser conduzidos a fim de evitar a acidificação. Além disso, o processamento dos frutos de dendê pode ocorrer em condições operacionais em que as lipases apresentam pouca ou nenhuma atividade lipolítica.

Referências

- ABIGOR, D. R.; OPUTE, F. I.; OPOKU, A. R.; OSAGIE, A. U. Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, n. 7, p. 599-606, 1985.
- BHATLA, S. C.; VANDANA, S.; KAUSHIK, V. Recent developments in the localization of oil body-associated signaling molecules during lipolysis in oilseeds. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 3, p. 176-182, 2009.
- BOURGIS, F.; KILARU, A.; CAO, X.; NGANDO-EBONGUE, G.-F.; DRIRA, N.; OHLROGGE, J. B.; ARONDEL, V. Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 30, p. 12527-12532, 2011.
- CADENA, T.; PRADA, F.; PEREA, A.; ROMERO, H. M. Lipase activity, mesocarp oil content, and iodine value in oil palm fruits of *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, and the interspecific hybrid O×G (*E. oleifera* × *E. guineensis*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 674-680, 2013.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; SILVA, P. R.; ROSA, T. S.; MOURA, N. M. L.; SANTOS, B. C. P.; CARVALHO, D. B.; SOUSA, J. S.; CARVALHINHO, M. T. J. E.; CASTRO, A. M.; FREIRE, D. M. G. Methods to prevent acidification of Macaúba (*Acrocomia aculeata*) fruit pulp oil: A promising oil for producing biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 703-707, 2015.
- DENDÊ. Disponível em: <http://www.sedap.pa.gov.br/content/dend%C3%AA>. Acesso em: 24 out. 2020.
- EBONGUE, G. F. N.; DHOUI, R.; CARRIÈRE, F.; ZOLLO, P. H. A.; ARONDEL, V. Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 611-617, 2006.
- HENDERSON, J.; OSBORNE, D. J. Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability *in vivo* and *in vitro*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1073-1078, 1991.
- LIMA, W. A. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; GREEN, M.; ABREU, S. C.; SIMONETTI, R. **Produção de sementes germinadas de dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq.) na Embrapa**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013. 14 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 41). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100641/1/Circ-Tec-41.pdf>. Acesso em: 21 out. 2020.
- MACÊDO, J. K. A.; RODRIGUES, D. S.; PACHECO, T. F.; MENDES, T. D.; SIQUEIRA, F. G.; FAVORETO, C.; ABDELNUR, P. V. Estudo da atividade enzimática de lipases presentes no mesocarpo de dendê (*Elaeis guineensis*). In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 3., 2016, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2016. p. 283-289.

MORCILLO, F.; CROS, D.; BILLOTTE, N.; NGANDO-EBONGUE, G. F.; DOMONHÉDO, H.; PIZOT, M.; CUÉLLAR, T.; ESPÉOUT, S.; DHOUIB, R.; BOURGIS, F.; CLAVEROL, S.; TRANBARGER, T. J.; NOUY, B.; ARONDEL, V. Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration. **Nature Communications**, v. 4, n. 2160, p. 1-8, 2013.

NAKAI, D. K.; COSTA, P. P. K. G.; RIBEIRO, J. A. A.; SOARES, I. P.; SALUM, T. F. C. Desenvolvimento de método de cromatografia líquida para identificação e quantificação simultânea dos principais produtos da transesterificação de óleo de soja. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DE BIODIESEL, 7., 2019, Florianópolis. **Empreendedorismo e inovação**: construindo um futuro competitivo para o biodiesel: anais. Florianópolis: Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, 2019. p. 157-158.

NEOH, B. K.; TEH, H. F.; NG, T. L. M.; TIONG, S. H.; THANG, Y. M.; ERSAD, M. A.; MOHAMED, M.; CHEW, F. T.; KULAVEERASINGAM, H.; APPLETON, D. R. Profiling of metabolites in oil palm mesocarp at different stages of oil biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1920-1927, 2013.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y. A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 6, p. 507-558, 2000.

TOMBS, M. P.; STUBBS, J. M. The absence of endogenous lipase from oil palm mesocarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 9, p. 892-897, 1982.

